

miR-452 靶向 PHLPP1 抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭

黄仲根¹, 徐波² 沈飞²

1. 广州市白云区第二人民医院外科, 广东 广州 510450;

2. 广州市第一人民医院外科, 广东 广州 510180

摘要: **目的** 探讨微小核糖核酸(micro RNA, miR)-452 靶向 PH 结构域富含亮氨酸重复序列的蛋白磷酸酶 1 (PHLPP1)抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭的作用。**方法** 选取 142 例结直肠癌组织及癌旁组织。体外培养结直肠癌细胞株 SW480 细胞 (SW480 癌细胞组),并以 miR-452 模拟物(miR-452 模拟物组)、miR-452 抑制剂(miR-452 抑制剂组)转染 SW480 细胞。噻唑蓝 (MTT)法检测各组细胞活力、癌细胞单克隆形成数目。流式细胞术检测凋亡率及细胞周期,Transwell 细胞迁移实验检测穿膜细胞数,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-452-5、PHLPP1 mRNA 表达水平,酶联免疫吸附法测定培养液中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、细胞周期蛋白 (Cyclin)D1、血管内皮生长因子 (VEGF)在培养液中水平。**结果** 结直肠癌组 miR-452-5p 相对表达水平 (1.25 ± 0.65) 低于癌旁组 ($3.76 \pm 0.43, t = 17.04, P < 0.01$)。依 miR-452 模拟物组→SW480 癌细胞组→miR-452 inhibitor 组之序,癌细胞单克隆形成数目、穿膜数 ($P < 0.01$) 升高,细胞凋亡率、G1 期比例降低 ($P < 0.01$); miR-452-5p、PHLPP1 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$),MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。miR-452 与 PHLPP1 表达水平呈明显正相关 ($P < 0.01$),与 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 表达水平分别呈负相关 ($P < 0.01$)。**结论** miR-452 通过靶向降低 PHLPP1 的表达而抑制结直肠癌细胞增殖、迁移浸润,其机制与 miR-452 诱导结直肠癌细胞低表达 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 有关。

关键词: 微小核糖核酸 A-452; PH 结构域富含亮氨酸重复序列的蛋白磷酸酶 1; 结直肠癌细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R 735.3*5 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)03-0340-06

Inhibitory effect of miR-452 on proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting PHLPP1

HUANG Zhong-gen*, XU Bo, SHEN Fei

* Department of Surgery, Baiyun District Second People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou, Guangdong 510450, China

Corresponding author: XU Bo, E-mail: 371837102@qq.com

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect of microRNA(miR)-452 on proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating PH domain leucine-rich-repeats protein phosphatase 1 (PHLPP1). **Methods** The colorectal cancer tissues and paracancerous tissues of 142 patients with colorectal cancer were selected. The colorectal cancer cell line SW480 cells were cultured in vitro (SW480 cancer cell group), and transfecting SW480 cells with miR-452 mimics(miR-452 mimics group) and miR-452 inhibitor(miR-452 inhibitor group). Thiazolam blue (MTT) method was used to detect cell viability, number of monoclonal formation of cancer cells. Flow cytometry was used to detect apoptosis rate and cell cycle. Transwell cell migration assay was used to detect number of penetrating cells. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction PCR (qRT-PCR) was used to detect expression levels of miR-452 and PHLPP1 mRNAs. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), Cyclin D1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in culture medium. **Results** The relative expression level of miR-452-5p in colorectal cancer group (1.25 ± 0.65) was lower than that in adjacent cancer group ($3.76 \pm 0.43, t = 17.04, P < 0.01$). According to the sequence of miR-452 mimic group, SW480 cancer cell group and miR-452 inhibitor group, the

number of monoclonal formation and the number of penetrating cells increased ($P < 0.01$), cell apoptosis rate and G1 phase proportion decreased ($P < 0.01$); the expression levels of miRNA-452-5p and PHLPP1 mRNA decreased ($P < 0.01$); the expression levels of MMP-9, Cyclin D1 and VEGF increased ($P < 0.01$). The expression of miR-452 was significantly positively correlated with PHLPP1 mRNA ($P < 0.01$) and was significantly negatively correlated with MMP-9, Cyclin D1 and VEGF respectively (all $P < 0.01$). **Conclusion** miR-452 inhibits the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells through targeting PHLPP1 for reducing its expression, and its mechanism may be related to the low expression of MMP-9, Cyclin D1 and VEGF in colorectal cancer cells induced by miR-452.

Key words: MicroRNA-452; PH domain leucine-rich-repeats protein phosphatase 1; Colorectal cancer cell; Proliferation; Migration; Invasion

Fund program: Medical Science and Technology Research Fund Project of Guangdong Province (A2017415)

结直肠癌是世界范围常见的癌症之一,虽然在诊断和治疗策略方面取得了进展,但结直肠癌晚期患者的临床结局和预后仍然较差^[1-2]。因此,了解调控结直肠癌发生和发展的分子机制,探索新的关键分子治疗靶点具有重要的临床意义。结直肠癌的发生是一个多基因和多步骤的过程,肿瘤蛋白的激活或肿瘤抑制基因的失活影响结直肠癌的多个方面,如细胞增殖、凋亡、侵袭和转移^[3-4]。微小核糖核酸(microRNAs, miRNA)是一类小的调控 RNA 分子,其通过以序列特异性方式结合靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3' UTR)来抑制蛋白质翻译。miRNAs 在物种间高度保守,参与各种基本生物学过程的调控,如发育、细胞分化、增殖、凋亡和代谢^[5-6]。近年来,miRNA 已被证明在人类癌症的发病机制中起着重要作用。一些 miRNA 表达潜在在结直肠癌的研究已经进行,一系列的 miRNAs (包括 miR-20、miR-21、miR-17-5p、miR-15b、miR-181b、和 miR-191) 已表明有价值的生物标志物和肿瘤的发生发展与结直肠癌的临床预后相关^[7]。miR-452 已被证明是调节细胞存活、增殖、侵袭和转移的关键因子^[8-9]。3'-UTR PH 结构域富含亮氨酸重复序列的蛋白磷酸酶 1(3'-UTR of PH domain leucine-rich-repeats protein phosphatase 1, PHLPP1) 起抑制肿瘤作用,能抑制原癌基因的表达^[10]。本研究拟探讨 miR-452 靶向 PHLPP1 抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,为结直肠癌的治疗提供理论及临床依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2014 年 1 月至 2017 年 5 月在广州市白云区第二人民医院和广州市第一人民医院行手术切除并经病理证实的结直肠癌患者 142 例,符合美国国家综合癌症网(NCCN)公布的 2012 版《NC-CNCR 诊治指南》中的诊断标准^[11]。手术切除标本后行病理检查以判定临床病理特征。同时取距结肠癌组织 5 cm 以上的正常结肠组织为癌旁组。患者自

愿提供结肠癌及正常结肠组织用作分析 miR-452 表达及与临床病理特征的关系。纳入标准:(1)经广州市第一人民医院病理学证实为结直肠癌标本组织;(2)患者术前未接受任何放、化疗;(3)既往无精神障碍史,意识清晰;(4)所有患者的预计生存期均 > 3 个月;(5)经广州市第一人民医院伦理委员会审核批准,患者均知情同意并签署知情同意书。排除标准:(1)治疗期间接受其他肿瘤化放疗的患者;(2)病史及随访资料不完整者。

1.2 结直肠癌癌组织及癌旁正常组织 miR-452 表达水平测定 用 Trizol 法(Trizol 试剂, Invitrogen, USA) 从结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织中提取总 RNA。使用 One Step PrimeScript miRNA cDNA 合成试剂盒(TaKaRa) 将 RNA 逆转录为 cDNA, 并使用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) 进行实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)。使用内源性 U6 核小 RNA 进行标准化(U6 正向引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'; 反向 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3')。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 miR-452 相对表达水平。PCR 引物的序列如下: miR-452 正向引物: 5'-AGT CTA TAC AAG GGC AAG CTC TC-3', 反向引物: 5'-CCC AAT ACG ACC AAA TCC GTT-3'。反应体系为: 正向引物 10 μ l、反向引物 10 μ l、RNA 模版 0.6 μ l、超级酶混合物 0.2 μ l、2 \times μ Byr 一步法 RT-qPCR 缓冲液 5 μ l、去 RNA 水 3.4 μ l。循环如下: 95 $^{\circ}$ C 持续 10 min, 进行 40 个循环, 持续 15 s 温度 60 $^{\circ}$ C。根据 miRNA-452 表达水平, 小于 1.25 为阴性, 大于 1.25 为阳性。

1.3 细胞来源、主要仪器与试剂 结肠直肠癌细胞系 SW480(American Type Culture Collection Cell Biology Collection)、DMEM 培养基(Invitrogen)、胰酶(美国 Gib-co 公司)、四甲基偶氮唑蓝(北京广源恒信科技)、miR-452 mimics、miR-452 inhibitor(上海伯豪生物技术)、吡啶橙(碧云天生物技术)、胎牛血清(武汉普诺赛生命科技)、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)、第一链 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa)、实时荧光

定量 PCR 仪(美国热电公司)、NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪(美国 Thermo 公司)、BD Biocoat™ Matrigel™ 基质(上海伟进生物科技)、聚碳酸脂微孔滤膜(上海正晁商贸有限公司)、细胞基质金属蛋白酶(MMP)-9、细胞周期素(Cyclin) D1、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白 ELISA 试剂盒(上海伯豪生物技术)、MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.4 细胞复苏培养及其分组设计

1.4.1 SW480 结肠直肠癌株培养方法 SW480 结肠直肠癌株在补充有 10% 胎牛血清(FBS, HyClone)和 1% 青霉素链霉素(Invitrogen)的 RPMI 1640 中培养(37 °C, 5% CO₂、20% O₂),当细胞融合率达到 80% 时,用 0.5% 胰蛋白酶消化传代。

1.4.2 分组设计 SW480 结肠直肠癌组:取 10 ml SW480 结肠直肠癌细胞液于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 CO₂ 培养箱(37 °C、5% CO₂、20% O₂);miR-452 mimics(模拟物)、miR-452 inhibitor(抑制剂)组:取 10 ml 转染 miR-452 mimics、miR-452 inhibitor 的 SW480 结肠直肠癌细胞液于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 CO₂ 培养箱(37 °C、5% CO₂、2% O₂)。各组每孔设 6 个平行样,培养 72 h。

1.4.3 SW480 结肠直肠癌细胞株 miR-452 mimics、miR-452 inhibitor 转染 取 10 ml SW480 结肠直肠癌细胞液接种于 6 孔板,取 100 pmol 的 miR-452 mimics、miR-452 inhibitor 于 200 μl DMEM 培养基中,取 4 μl lipofectamine2000 于 200 μl DMEM 培养基中,混匀 lipofectamine2000 和 miRNA 液,室温培育 30 min,无菌 PBS 洗涤细胞,将混合液加入细胞孔内,6 h 后弃混合液,加入胎牛血清的 DMEM 培养基培养,流式细胞仪检测转染情况。

1.5 SW480 结肠直肠癌细胞活力的 MTT 法检测及癌细胞单克隆形成数目检测 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)10 μl,37 °C 恒温箱孵育 4 h,加入 150 μl 的二甲基亚砜(DMSO),采用酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度(OD)值;将细胞在含有 DMEM 的 10% 胎牛血清中的 12 孔板(1 × 10³ 细胞/孔)中培养。培养 5 d 后,用亚甲蓝染色细胞,确定 5 个成像区域中的菌落形成数目。

1.6 SW480 结肠直肠癌细胞株细胞凋亡及细胞周期测定 SW480 结肠直肠癌细胞培养 72 h 后,通过胰蛋白酶消化收集细胞。然后将细胞用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)溶液在黑暗中染色 15 min。最后,细胞进行流式细胞术分析检测细胞凋亡及细胞周期。

1.7 Transwell 细胞迁移实验 2 mm 厚的 Matrigel

凝胶(8.2 g/L)均匀平铺于聚碳酸脂微孔滤膜上,各取三组 60 μl SW480 结肠直肠癌细胞液(细胞浓度为 5 × 10⁶/ml)加入小室,并加入 1 000 μl 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基;室温培育 12 h 后,使用无菌医用棉签轻微刮除滤膜小室的细胞,4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色 30 min。高倍镜下取中心及四周各 5 个视野,计数每个视野内穿过 8 μm 微孔的细胞数。

1.8 SW480 结肠直肠癌细胞 miR-452、PHLPP1 mRNA 水平测定 上述三组 SW480 结肠直肠癌细胞培养结束后,无菌收集细胞。取 5 ml 细胞液(细胞浓度为 5 × 10⁶/ml),5 000 rpm 离心 5 min 后,-70 °C 冻存备用,实时荧光定量 PCR 测定 miR-452、PHLPP1 mRNA 表达水平,方法同 1.2。PHLPP1 正向引物:5'-ATT TCA CCA ATC TTG TCT CCA TCA-3',反向引物:5'CTC CTC CTG TTC GAC AGT CAG C-3'。

1.9 SW480 结肠直肠癌 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白水平测定 染毒结束后,5 000 rpm 离心收集各组细胞,加入 PBS 制成细胞悬液后,酶联免疫吸附法测定培养液中 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白水平。

1.10 统计学分析 用 SPSS 19.0 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组 *t* 检验及单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验;相关分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 α 为 0.05。

2 结果

2.1 癌旁组、结肠直肠癌组中 miR-452 水平 结肠直肠癌组 miR-452 相对表达水平(1.25 ± 0.65)低于癌旁组(3.76 ± 0.43, *t* = 17.04, *P* < 0.01)。

2.2 miR-452 RNA 表达与临床病理特征的关系 miR-452 RNA 表达在不同年龄间相当(*P* > 0.05);有淋巴血管间隙浸润、病理学分期高、TNM 分期高、有淋巴结转移、浸润深度深、有复发、肿瘤最大径 ≥ 5 cm 者 miR-452 阳性表达率降低(*P* < 0.01)。见表 1。

2.3 各组 SW480 癌细胞 OD 值、存活率比较 miR-452 mimics 组 OD 值、存活率低于癌细胞组(*P* < 0.01),癌细胞组 OD 值、存活率水平低于 miR-452 inhibitor 组(*P* < 0.01),miR-452 inhibitor 组 OD 值、存活率水平高于 miR-452 mimics 组(*P* < 0.01)。见表 2。

2.4 各组 SW480 癌细胞单克隆形成数目比较 miR-452 mimics 组克隆形成数目低于 SW480 癌细胞组(*P* < 0.01),SW480 癌细胞组克隆形成数目低于 miR-452 inhibitor 组(*P* < 0.01)。见表 2。

2.5 各组 SW480 癌细胞穿膜数比较 miR-452

mimics 组细胞穿膜数低于 SW480 癌细胞组 ($P < 0.01$), miR-452 inhibitor 组穿膜数分别高于 SW480 癌细胞组和 miR-452 mimics 组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 1。

2.6 各组 SW480 癌细胞凋亡率的表达 miR-452 mimics 组细胞凋亡率高于 SW480 癌细胞组 ($P < 0.01$), SW480 癌细胞组细胞凋亡率高于 miR-452 inhibitor 组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 2。

2.7 各组 SW480 癌细胞 G1 期比较 miR-452 mimics 组 G1 期高于 SW480 癌细胞组 ($P < 0.01$), SW480 癌细胞组 G1 期高于 miR-452 inhibitor 组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 3。

2.8 各组 SW480 癌细胞 miR-452、PHLPP1 mRNA 表达水平比较 miR-452 mimics 组 miR-452、PHLPP1

mRNA 表达水平高于 SW480 癌细胞组 ($P < 0.01$), SW480 癌细胞组 miR-452、PHLPP1 mRNA 表达水平高于 miR-452 inhibitor 组 ($P < 0.01$)。见表 4。

2.9 各组 SW480 癌细胞 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白表达水平比较 miR-452 mimics 组 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白表达水平低于 SW480 癌细胞组 ($P < 0.01$), SW480 癌细胞组 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白表达水平低于 miR-452 inhibitor 组 ($P < 0.01$)。见表 5。

2.10 各变量的相关性分析 miR-452 与 PHLPP1 表达水平呈正相关 ($r = 0.569, P < 0.01$); 与 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 表达水平呈负相关 ($r = -0.644, P < 0.01, r = -0.543, P < 0.01, r = -0.476, P < 0.01$)。

表 1 miR-452 RNA 表达与临床病理特征的关系 例(%)

临床特征	例数	miR-452-5p 表达		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
年龄					
<50 岁	34	25(73.5)	9(26.5)	0.157	>0.05
≥50 岁	108	83(76.8)	25(23.2)		
TNM 分期					
I ~ II	76	72(94.7)	4(4.3)	31.334	<0.01
III ~ IV	66	36(54.5)	30(45.5)		
病理学分级					
低分化	44	42(95.4)	2(4.6)	18.844	<0.01
中分化	46	36(78.3)	10(21.7)		
高分化	52	30(57.7)	22(42.3)		
复发					
无	64	61(95.3)	3(4.7)	23.724	<0.01
有	78	47(60.2)	31(39.8)		
浸润深度					
无浸润	40	38(95.0)	2(5.0)	24.756	<0.01
浸润 <6 cm	51	43(84.3)	8(15.7)		
浸润 ≥6 cm	51	27(52.9)	24(47.1)		
淋巴血管间隙浸润					
无	88	84(95.4)	4(4.6)	47.816	<0.01
有	54	24(44.4)	30(55.6)		
肿瘤最大径					
<5 cm	78	71(90.2)	7(9.8)	21.295	<0.01
≥5 cm	64	37(57.8)	27(42.2)		
淋巴结转移					
无	60	55(91.6)	5(8.4)	13.903	<0.01
有	82	53(64.6)	29(35.4)		

表 2 各组 SW480 癌细胞 OD 值、存活率、单克隆形成数目比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	存活率 (%)	单克隆形成数目
miR-452 mimics 组	0.64 ± 0.02 ^a	52.01 ± 8.24 ^a	48.25 ± 9.58 ^a
SW480 癌细胞组	0.72 ± 0.05	78.52 ± 8.25	75.32 ± 10.25
miR-452 inhibitor 组	0.92 ± 0.05 ^{ab}	96.21 ± 3.21 ^{ab}	134.12 ± 8.32 ^{ab}

注:与癌细胞组比, ^a $P < 0.01$;与 miR-452 mimics 组比, ^b $P < 0.01$ 。

表 3 各组 SW480 癌细胞凋亡率、细胞周期及穿膜数比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率 (%)	G1 期 (%)	穿膜数
miR-452 mimics 组	14.84 ± 2.87 ^a	66.38 ± 0.95 ^a	234 ± 25 ^b
SW480 癌细胞组	11.70 ± 2.54	64.66 ± 1.06	423 ± 43
miR-452 inhibitor 组	7.94 ± 2.12 ^{ab}	59.02 ± 0.84 ^{ab}	557 ± 19 ^{ab}

注:与癌细胞组比, ^a $P < 0.01$;与 miR-452 mimics 组比, ^b $P < 0.01$ 。

表 4 各组 SW480 癌细胞 miR-452-5p、PHLPP1 mRNA 表达水平比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

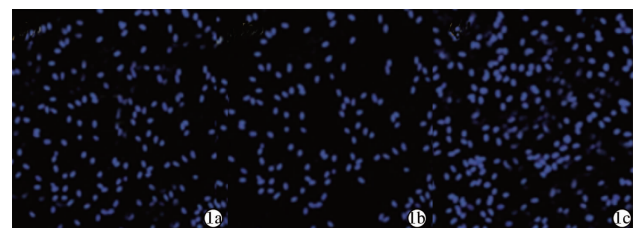
组别	miR-452 mRNA	PHLPP1 mRNA
miR-452 mimics 组	3.45 ± 0.29 ^a	5.69 ± 0.25 ^a
SW480 癌细胞组	1.91 ± 0.17	2.56 ± 0.29
miR-452 inhibitor 组	0.67 ± 0.23 ^{ab}	0.98 ± 0.23 ^{ab}

注:与癌细胞组比, ^a $P < 0.01$;与 miR-452 mimics 组比, ^b $P < 0.01$ 。

表 5 各组 SW480 癌细胞 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白表达水平比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

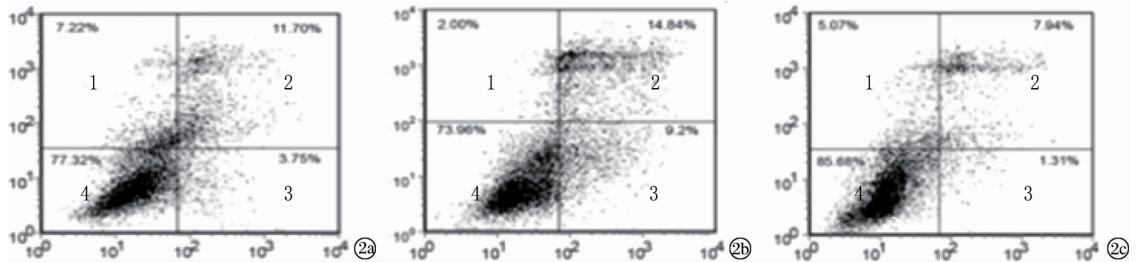
组别	MMP-9	Cyclin D1	VEGF
	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)
miR-452 mimics 组	209.32 ± 20.14 ^a	198.21 ± 12.54 ^a	443.76 ± 32.76 ^a
SW480 癌细胞组	314.36 ± 19.25	354.21 ± 16.32	630.87 ± 14.87
miR-452 inhibitor 组	469.25 ± 5.25 ^{ab}	698.24 ± 20.45 ^{ab}	879.52 ± 19.58 ^{ab}

注:与癌细胞组比, ^a $P < 0.01$;与 miR-452 mimics 组比, ^b $P < 0.01$ 。



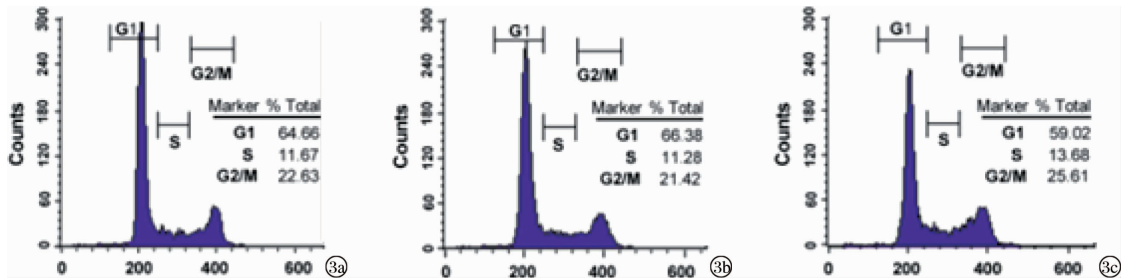
注:1a:癌细胞组;1b:miR-452 mimics 组;1c:miR-452 inhibitor 组。

图 1 各组癌细胞穿膜数比较



注:2a:癌细胞组;2b:miR-452 mimics 组;2c:miR-452 inhibitor 组。第 2 象限为促进凋亡,第 4 象限为抑制凋亡。

图 2 各组癌细胞凋亡率的比较



注:3a:癌细胞组;3b:miR-452 mimics 组;3c:miR-452 inhibitor 组。

图 3 各组癌细胞 G1 期比较

3 讨论

miRNA 是具有特异性序列的负调控靶基因,其可作为原癌基因或抑癌基因调控肿瘤的增殖、侵袭。最近的证据表明,miRNA 在多种生物学过程相关的癌症中发挥重要作用,包括细胞分化、增殖和血管生成、侵袭、转移等。miRNA-452 表达水平的下调已在肝癌、胰腺癌、乳腺癌和肾癌中观察到^[12-14]。肝癌体外试验表明,核因子(NF)- κ B p65 可直接抑制 miRNA-452 的表达转录进而直接抑制肝癌细胞的迁移和侵袭^[15]。此外,在急性淋巴细胞白血病细胞中,miRNA-452 可抑制细胞的增殖^[16]。本研究结果显示,结肠直肠癌组 miRNA-452-5p 水平低于癌旁组,且在有淋巴血管间隙浸润、病理学分期高、TNM 分期高、有淋巴结转移、浸润深度深、有复发、肿瘤最大径 ≥ 5 cm 者 miR-452 表达率降低。说明 miR-452 低表达能促进结肠直肠癌细胞增殖、浸润,这与上述讨论符合。

细胞学试验表明,miR-452 抑制肝癌细胞增殖的分子机制与 G1-S 相变的加速,细胞周期蛋白抑制蛋白 p21^{Cip1} 和 p27^{Kip1} 的下调以及 Cyclin D1 的上调有关。miR-452 是 PI3K/AKT 信号转导以及细胞周期进展至 G1 期的必要条件^[12]。此外,PI3K/AKT 的激活增加 p21^{Cip1} 和 p27^{Kip1} 的细胞水平,并抑制 Cyclin D1 的表达,从而抑制细胞增殖。本研究通过向 SW480 癌细胞组转染 miR-452 mimics 及 miR-452 inhibitor 发现,miR-452 mimics 组克隆形成数目、穿膜数低于 SW480 癌细胞组,细胞凋亡率、G1 期高于 SW480 癌细胞组;miR-452 inhibitor 组克隆形成数目、穿膜数高

于 SW480 癌细胞组,细胞凋亡率、G1 期低于 SW480 癌细胞组;miR-452 inhibitor 组克隆形成数目、穿膜数高于 miR-452 mimics 组,细胞凋亡率、G1 期低于 SW480 癌细胞组,说明 miR-452 能明显抑制结肠直肠癌细胞增殖、迁移、浸润,加速结肠直肠癌细胞凋亡与 G1 进程。

有研究显示 PHLPP1 是 miR-452 的靶基因^[17]。PHLPP1 属于 Ser/Thr 蛋白磷酸酶的新家族,能负调节蛋白激酶 B(AKT),磷酸肌醇(PKC),促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 Mst1 激活的信号通路,在维持细胞存活抑制中发挥重要作用。近期研究表明 PHLPP1 是肿瘤抑制基因^[18],其在多种人类癌症中(乳腺癌、前列腺癌、肝癌等)低表达。作为 Ser/Thr 蛋白磷酸酶,PHLPP1 可直接使 AKT 去磷酸化以抑制 AKT 信号传导活性,从而促进细胞凋亡^[19]。在体外和异种移植模型中,PHLPP1 在癌细胞系中的过表达降低了细胞增殖和肿瘤发生。在肺癌细胞中,PHLPP1 的稳定过表达阻断了 G2-M 转换或诱导 G1 细胞周期停滞,从而降低了细胞增殖速率。本研究结果显示,依 miR-452 模拟物组 \rightarrow SW480 癌细胞组 \rightarrow miR-452 inhibitor 组之序,miR-452-5p、PHLPP1 mRNA 表达水平降低,MMP-9、Cyclin D1、VEGF 蛋白表达水平升高。miRNA-452 与 PHLPP1 正相关关系明显;与 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 负相关关系明显。这也论证了,miR-452 能靶向抑制 PHLPP1 的表达进而抑制结肠直肠癌细胞增殖、迁移、浸润;同时也说明其抑制机制可能与抑制 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 的表达有关。

综上所述,miR-452 通过靶向降低 PHLPP1 的表

达而抑制结直肠癌细胞增殖、迁移、浸润,其机制与 miR-452 诱导结直肠癌细胞低表达 MMP-9、Cyclin D1、VEGF 有关。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3):177-193.
- [2] Levi F, Pasche C, Lucchini F, et al. Macronutrients and colorectal cancer; a Swiss case-control study. [J]. Ann Oncol, 2017, 13(3):369-373.
- [3] Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. Gut, 2017, 66(4):683-691.
- [4] Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, et al. Colorectal cancer screening: recommendations for physicians and patients from the U. S. multi-society task force on colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2017, 153(1):307-323.
- [5] Vienberg S, Geiger J, Madsen S, et al. MicroRNAs in Metabolism [J]. Acta Physiol (Oxf), 2016, 219(2):346.
- [6] Aryal B, Singh AK, Rotllan N, et al. MicroRNAs and lipid metabolism[J]. Curr Opin Lipidol, 2017, 28(3):273-280.
- [7] Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, et al. Role of microRNAs in translation regulation and cancer[J]. World J Biol Chem, 2017, 8(1):45-56.
- [8] Lin CY, Tzeng HE, Li TM, et al. WISP-3 inhibition of miR-452 promotes VEGF-A expression in chondrosarcoma cells and induces endothelial progenitor cells angiogenesis [J]. Oncotarget, 2017, 8(24):39571-39581.
- [9] Kim M, Jang K, Miller P, et al. VEGFA links self-renewal and metastasis by inducing Sox2 to repress miR-452, driving Slug[J]. Oncogene, 2017, 36(36):5199-5211.
- [10] Mason JA, Schafer ZT. SGK-1 and PHLPP1: Ras-mediated effectors during ECM-detachment [J]. Cell Cycle, 2016, 15(17):2233-2234.
- [11] Benson AB 3rd, Arnoletti JP, Bekaii-Saab T, et al. Anal Carcinoma, Version 2. 2012; featured updates to the NCCN guidelines [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2012, 10(4):449-454.
- [12] Zhang Y, Han L, Pang J, et al. Expression of microRNA-452 via adenoviral vector inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation and metastasis [J]. Tumour Biol, 2016, 37(6):8259-8270.
- [13] Li RZ, Wang LM. Decreased microRNA-452 expression and its prognostic significance in human osteosarcoma [J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1):150.
- [14] 凌迎春, 周月琴, 沈群弟, 等. 乳腺癌患者抑郁状态评分及其相关 microRNA 表达的临床分析 [J]. 中华全科医学, 2018, 16(1):110-112.
- [15] Zheng ZY, Liu JM, Yang Z, et al. MicroRNA-452 promotes stem-like cells of hepatocellular carcinoma by inhibiting sox7 involving wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(19):28000-28012.
- [16] Wang H, Guo Q, Zhu G, et al. microRNA-452 exerts growth-suppressive activity against T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. J Investig Med, 2018, 66(4):773-779.
- [17] Batra SK, Jain M, Rachagani S, et al. MicroRNAs (miRNAs) as biomarker(s) for prognosis and diagnosis of gastrointestinal (GI) cancers [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(33):5287-5297.
- [18] Moc C, Taylor AE, Chesini GP, et al. Physiological activation of Akt by PHLPP1 deletion protects against pathological hypertrophy [J]. Cardiovasc Res, 2015, 105(2):160-170.
- [19] Jackson TC, Verrier JD, Semple-Rowland S, et al. PHLPP1 splice variants differentially regulate AKT and PKC α signaling in hippocampal neurons; characterization of PHLPP proteins in the adult hippocampus [J]. J Neurochem, 2010, 115(4):941-955.

收稿日期:2018-08-23 编辑:王国品

· 读者 · 作者 · 编者 ·

对作者署名的一般要求

作者姓名在文题下按序排列,具体排序应在投稿前即确定,在编排过程中不应再作改动,确需要改动时必须出示单位证明。作者应是:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析与解释者;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。同时具备以上3项条件者方可署名为作者。仅参与研究项目资金的获得或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也宜列为作者。对文章中的各主要结论,均必须至少有1位作者负责。如有外籍作者,应征得本人同意,并在投稿时向编辑部提供相应证明材料。集体署名的文稿,在题名下列出单位,并于文末列出整理者姓名,并须明确对该文的主要负责人,在论文首页脚注通讯作者姓名、单位、邮政编码及 E-mail 地址。通讯作者一般只列1位,由投稿者确定。如需注明协作组成员,则于文末参考文献前列出协作组成员的单位及姓名。

本刊编辑部